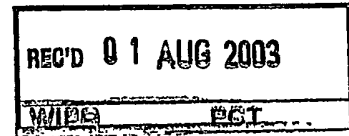


13.06.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 2003年 3月17日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-071744  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2003-071744]

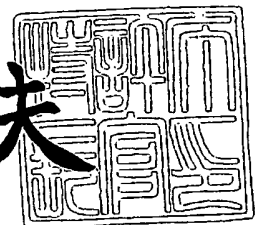
出願人 早出 広司  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 PSD-0017

【提出日】 平成15年 3月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 東京都目黒区南 1-13-16

【氏名】 早出 広司

【特許出願人】

【識別番号】 596153357

【氏名又は名称】 早出 広司

【代理人】

【識別番号】 100105991

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 玲子

【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100106840

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 耕司

【電話番号】 03-5521-1530

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-172955

【出願日】 平成14年 6月13日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 112462

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの349番目から377番目の残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ阻害定数(K<sub>s i</sub>)が200mM以上であるグルコース脱水素酵素。

【請求項2】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の365番目のメチオニンが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK<sub>s i</sub>が200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項3】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の365番目のメチオニンがトリプトファンまたはフェニルアラニンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項4】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の366番目のトレオニンが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK<sub>s i</sub>が200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項5】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の366番目のトレオニンがアスパラギン酸、リジン、イソロイシンまたはアスパラギンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項6】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の367番目のチロシンが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK<sub>s i</sub>が200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項7】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の367番目のチロシンがアスパラギン酸で置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項8】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の368番目のイソロイシンが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK<sub>s i</sub>が200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項9】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の368番目のイソロイ

シンがアスパラギンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項10】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の369番目のシステインが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK s iが200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項11】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の369番目のシステインがアルギニンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項12】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の374番目のアラニンが他のアミノ酸残基で置換されており、かつK s iが200mM以上である、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項13】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の374番目のアラニンがプロリンで置換されている、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項14】 配列:

Cys Gly Glu Xaa Thr Tyr Ile

(式中、XaaはMetまたはTrpである)を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項15】 配列:

Gly Glu Met Xaa Tyr Ile Cys

(式中、XaaはAsp、Lys、IleまたはAsnである)を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項16】 配列:

Glu Met Thr Asp Ile Cys Trp

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項17】 配列:

Met Thr Tyr Asp Cys Trp Pro

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項18】 配列:

Thr Tyr Ile Arg Trp Pro Thr

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項 19】 配列:

Pro Thr Val Pro Pro Ser Ser

を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項 20】 請求項 1-19 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 22】 請求項 20 に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項 23】 請求項 20 に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項 22 記載の形質転換体。

【請求項 24】 請求項 23 に記載の形質転換体を培養し、菌体から水溶性画分を調製することを含む、水溶性 PQQGDH の製造方法。

【請求項 25】 請求項 1-19 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

【請求項 26】 請求項 1-19 のいずれかに記載のグルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はピロロキノリンキノン (PQQ) を補酵素とするグルコース脱水素酵素 (GDH) の特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素に関する。本発明の改変型酵素は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【0002】

【従来の技術】

血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグ

ルコースオキシダーゼ (GOD) あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素 (G6PDH) を用いる酵素法により定量されていた。最近、新たな酵素としてピロロキノリンキノン補酵素とするグルコース脱水素酵素 (PQQGDH) の応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。

### 【0003】

PQQGDHは、ピロロキノリンキノン補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは *Acinetobacter calcoaceticus* のいくつかの株においてその存在が確認されており (Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (Mol. Gen. Genet. (1989), 217: 430-436)。A. calcoaceticus由来水溶性PQQGDHは、分子量約50kDaのサブユニット2つからなるホモダイマーを形成する水溶性酵素であり、活性を示すためにPQQと $Ca^{2+}$ を必要とし、2200U/mg~7400U/mgという高い酵素活性を示す。等電点が、PQQと結合していないアポ酵素で約9.2、ホロ酵素で約10.2である塩基性蛋白質であることなどが知られている (K. Matsushita, et al. (1995) Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1548-1555)。また、水溶性PQQGDHのX線構造解析の結果が発表されており (A. Oubrie, et al. (1999) J. Mol. Bio., 289, 319-333、A. Oubrie, et al. (1999) The EMBO Journal, 18 (19), 5187-5194およびA. Oubrie, et al. (1999), PNAS 96 (21),

11787-11791)、水溶性PQQGDHの立体構造やPQQおよびCa<sup>2+</sup>の推定存在位置などが明らかにされている。

#### 【0004】

野生型水溶性PQQGDHでは、グルコース濃度が100mM以上のとき基質阻害による活性の低下が顕著に見られる。このため、高濃度の基質の存在下では、定量的な基質濃度の測定を行うことが困難である。現在のところ、この基質阻害のメカニズムは明らかにされていない。

#### 【0005】

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。

##### 【非特許文献1】

Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436

##### 【非特許文献2】

A. Oubrie, et al. (1999) J. Mol. Bio. , 289, 319-333

##### 【非特許文献3】

A. Oubrie, et al. (1999). The EMBO Journal, 18(19), 5187-5194

##### 【非特許文献4】

A. Oubrie, et al. (1999), PNAS 96(21), 11787-11791

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明は、基質阻害による酵素活性の低下が少ない改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良して高濃度のグルコースの存在下においてもグルコースの定量を可能とする改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースによる基質阻害の少ない酵素を得ることに成功した。

#### 【0008】



すなわち、本発明は、ピロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの349番目から377番目の残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ阻害定数 ( $K_{si}$ ) が200mM以上であるグルコース脱水素酵素を提供する。

#### 【0009】

本明細書において用いる場合、阻害定数 ( $K_{si}$ ) とは、観察される最大酵素活性の二分の一の活性を与える基質濃度のうち、高濃度側の基質濃度を意味する。阻害定数とは、酵素活性において基質阻害が観察されるときにおいて、次式で定義される酵素固有の定数を意味する：

$$v = V_{max} / [1 + (K_m/S) + (S/K'_{si})]$$

[ただし、 $v$ は反応速度、 $V_{max}$ は最大反応速度、 $K_m$ はミハエリス・メンテン定数、 $S$ は基質濃度、 $K'_{si}$ は阻害定数の理論値を表す]。 $K'_{si}$ が大きいほど、基質阻害が見られる基質濃度が大きくなり、基質阻害が緩和される。夾雑物を含む系で $K'_{si}$ を正確に測定することは困難であるため、本明細書においては、実測可能な値として上述した $K_{si}$ を用いる。

#### 【0010】

特定の理論に拘束されるものではないが、A. Oubrieらが明らかにしたPQQGDHの立体構造に基づくトポロジーの予測にしたがえば、349番目から377番目のアミノ酸の領域は4D5Aループを形成する領域に該当するため、この領域が基質であるグルコースとの相互作用に関与していると考えられる。

#### 【0011】

本明細書においてアミノ酸残基または領域に関して用いる場合、「相当する」との用語は、構造上類似するが同一ではない2以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の機能を有することを表す。例えば、*Acinetobacter calcoaceticus* 以外の生物に由来する水溶性PQQGDHにおいて、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの349番目から377番目の残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると合理的に考えられる場

合、該領域は「Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの349番目から377番目の残基の領域に相当する」と言われる。さらに、該領域の第17番目のアミノ酸残基は「Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの365番目の残基に相当する」と言われる。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

#### 【0012】

好ましくは、本発明のグルコース脱水素酵素は、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、365番目のメチオニン、366番目のトレオニン、367番目のチロシン、368番目のイソロイシン、369番目のシステインおよび374番目のアラニンからなる群より選択されるアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする。

#### 【0013】

より好ましくは、本発明のグルコース脱水素酵素は、配列番号1で表されるアミノ酸配列において、Met365Trp、Met365Phe、Thr366Asn、Thr366Ile、Thr366Asp、Thr366Lys、Tyr367Asp、Ile368Asn、Cys369ArgおよびAla374Proからなる群より選択される変異を有する。

#### 【0014】

また別の観点においては、本発明は、

Cys Gly Glu Xaa Thr Tyr Ile

(式中、XaaはMetまたはTrpである)；

Gly Glu Met Xaa Tyr Ile Cys

(式中、XaaはAsp、Lys、IleまたはAsnである)；

Glu Met Thr Asp Ile Cys Trp；

Met Thr Tyr Asp Cys Trp Pro；

Thr Tyr Ile Arg Trp Pro Thr；および

Pro Thr Val Pro Pro Ser Ser

からなる群より選択される配列を含む、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素を提供する。

#### 【0015】

本発明はまた、上述のPQQGDHをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、および本発明のPQQGDHの製造方法、ならびに本発明のPQQGDHを含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

#### 【0016】

本発明のPQQGDHの酵素蛋白質はグルコースによる基質阻害が小さいため、高濃度のグルコースの存在下におけるグルコースの測定に有用である。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

##### 改変型PQQGDHの製造方法

*Acinetobacter calcoaceticus* 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

#### 【0018】

本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、置換すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列を、所望のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られており、例えば、Sambrookら, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

#### 【0019】

このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

#### 【0020】

本発明の改変型PQQGDHにおいては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ

活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrookら, "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載されている。

#### 【0021】

さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHの349番目から377番目の領域に相当する領域を容易に認識することができ、本発明にしたがって、この領域中のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、基質阻害の減少した改変型PQQGDHを得ることができる。これらの改変型PQQGDHも本発明の範囲内である。

#### 【0022】

上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。

#### 【0023】

次に、得られた水溶性画分を、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製する。精製は、蛋白質のクロマトグラフィー精製についての当該技術分野において一般に知られる教科書の記載にしたがって行うことができる。蛋白質の精製に用いることができる種々の陽イオン交換クロマトグラフィー用カラムが当該技術分野において知られており、これらのいずれを用いてもよい。例えば、CM-5PW、CM-Toyopearl 650M、SP-5PW（以上、東ソー株式会社）、S-セファロース、Mono-S、S-Resource（以上ファルマシア社）を用いることができる。カラムを適当なバッファーで平衡化し、試料をカ

ラムに負荷し、未吸着成分を洗い流す。バッファーとしては、例えばリン酸バッファー、MOPSバッファー等を用いることができる。

#### 【0024】

次に、塩濃度のより高いバッファーを用いて、カラムに吸着された成分を溶出する。塩濃度は、塩濃度の異なる複数のバッファーを用いて、段階的に、直線勾配により、またはこれらの組み合わせにより変化させることができる。試料の溶出は吸光度測定などによりモニターし、適当な量ずつ分取する。各画分について酵素活性を測定して、所望の画分を回収することにより、本発明の改変型酵素を精製標品として得ることができる。

#### 【0025】

さらに、陽イオンクロマトグラフィーの前または後に、必要に応じて、濾過、透析、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の、蛋白質の精製に関して当該技術分野において知られる他の手法による精製を行ってもよい。

#### 【0026】

##### 酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

#### 【0027】

##### グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディ

エーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

#### 【0028】

##### グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドの遊離官能基をブロックする。

#### 【0029】

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl<sub>2</sub>、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【0030】

【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0031】

実施例 1

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示されるAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、変異の導入を行った。プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、Acinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである（図1）。常法に従って部位特異的変異法により、天然のPQQGDHをコードする塩基配列をそれぞれ目的とする変異を有するPQQGDHをコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を以下に示す。

Met365Trp 3'-GT TGA ACA CCT CTC CCA TGG ATG TAA AC-5'

Met365Phe 3'-GT TGA ACA CCT CTC CCT TGG ATG TAA AC-5'

Thr366Asn 3'-GGT TGA ACA CCT CTC TAC TTG ATG TAA ACG AC-5'

Thr366Ile 3'-GGT TGA ACA CCT CTC TAC TAG ATG TAA ACG AC-5'

Thr366Asp 3'-GA ACA CCT CTC TAC CTG ATG TAA ACG ACC G-5'

Thr366Lys 3'-GA ACA CCT CTC TAC TTT ATG TAA ACG ACC G-5'

Tyr367Asp 3'-GGT TGA ACA CCT CTC TAC TGG CTG TAA ACG ACC-5'

Ile368Asn 3'-AC TGG ATG TTA ACG ACC GG-5'

Cys369Arg 3'-GG ATG TAA ACG ACC GGT TGT C-5'

Ala374Pro 3'-C GGT TGT CAA GGT GGC AGT AGA CG-5'

【0032】

ベクタープラスミドpKF18k（宝酒造（株））にAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を

組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50 fmol と宝酒造 (株) 製 Mutan (登録商標) -Express Km キットに付属のセレクションプライマー 5 pmol、リン酸化したターゲットプライマー 50 pmol を全体 (20  $\mu$ l) の 1/10 量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100  $^{\circ}$ C、3 分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1 本鎖にした。セレクションプライマーは pKF18k のカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを 5 分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに 3  $\mu$ l の同キットエクステンションバッファー、1  $\mu$ l の T4 DNA リガーゼ、1  $\mu$ l の T4 DNA ポリメラーゼおよび 5  $\mu$ l の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。これを DNA のミスマッチ修復能欠損株である E. coli BMH71-18 mutS に形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

#### 【0033】

次に、菌体から抽出したプラスミドを E. coli MV1184 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド pGB2 上の野生型 PQQGDH をコードする遺伝子の Kpn I-Hind III 断片と入れ替え、各変異を有する改変型 PQQGDH の遺伝子を構築した。

#### 【0034】

#### 実施例 2

##### 改変型酵素の調製

野生型または改変型 PQQGDH をコードする遺伝子を、E. coli 用の発現ベクターである pTrc99A (ファルマシア社) のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドを大腸菌 DH5 $\alpha$  株に形質転換した。これを 450 ml の L 培地 (アンピシリン 50  $\mu$ g/ml 含有) で坂口フラスコを用いて 37  $^{\circ}$ C で一晚振とう培養し、1 mM CaCl<sub>2</sub>、500  $\mu$ M PQQ を含む 7 L の L 培地に植菌した。培養開始後約 3 時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度 0.3 mM になるように添加し、その後 1.5 時間培養した。菌体を遠心分離 (5,000  $\times$  g, 10 min, 4  $^{\circ}$ C) で集菌した後、0.85% NaCl



溶液で2回洗浄した。この菌体を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で懸濁し、フレンチ・プレスで破碎(110MPa)した後、遠心分離(15,000×g, 15min, 4℃)を2回行い、未破碎菌体を沈殿として除去した。この上清を超遠心分離(40,000r.p.m., 90min, 4℃)し、その上清を水溶液画分として得た。これをAバッファー(10mM MOPS-NaOH緩衝液(pH7.0))で4℃にて一晚透析し、粗精製画分を得た。

#### 【0035】

##### 実施例4

##### 酵素活性の測定

酵素活性の測定は、室温で10mM MOPS-NaOH緩衝液(pH7.0)中においてPMS(フェナジンメトサルフェート)-DCIP(2,6-ジクロロフェノールインドフェノール)を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1μmolのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3mM<sup>-1</sup>とした。

#### 【0036】

##### 実施例5

##### 基質阻害の評価

実施例3で得られた野生型PQQGDHおよび各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品を用いて、実施例5と同様にそれぞれ1μMPQQ、1mM CaCl<sub>2</sub>存在下で1時間以上ホロ化した。これを187μlずつ分注し、3μlの活性試薬(6mMDCIP48μl, 600mMPMS 8μl, 10mMリン酸緩衝液pH7.0 16μl)および各濃度のD-グルコース溶液10μlを加え、実施例4に示す方法により室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、K<sub>m</sub>、V<sub>max</sub>およびK<sub>si</sub>を求めた。結果を表1に示す。また、Tyr367AspのSVプロットおよびCys369ArgのSVプロットをそれぞれ図3および図4に示す。これらの結果から明らかなように、本発明の改変型PQQGDHは野生型PQQGDHと比較して高いK<sub>si</sub>値を示し、基質

阻害が有意に低下していた。

【0037】

【表1】

	Km (mM)	Vmax (U/mg 蛋白質)	Ksi (mM)	Ksi/Km
野生型	23	154	196	8
Met365Phe	36	619	394	10
Met365Trp	38	89	458	12
Thr366Asn	32	300	500	15
Thr366Ile	39	87	228	6
Thr366Asp	35	196	556	16
Thr366Lys	23	300	202	9
Tyr367Asp	280	11	830	3
Ile368Asn	61	60	535	9
Cys369Arg	65	6	1402	22
Ala374Pro	n.d.	2	250	n.d.

【0038】

#### 実施例6

##### 酵素の精製

実施例2で得られた粗精製酵素を10mMリン酸緩衝液pH7.0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSK gel CM-TOYO PEARL 650M（東ソー株式会社）に吸着させた。このカラムを10mMリン酸緩衝液pH7.0、750mlで洗浄した後、0-0.2M NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は5ml/minで行った。GDH活性を有する画分を回収し、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型PQQGDH蛋白質を得た。得られた精製酵素標品について、0.6mMのPMS存在下で、酵素活性および基質の阻害を測定した。結果を表2に示す。本発明の改変型酵素Thr366AsnおよびThr366Aspは、高いKsi値を有するのみ

ならず、野生型と匹敵するかまたはそれより高い酵素活性を示した。

【0039】

【表2】

	Km (mM)	Vmax (U/mg 蛋白質)	kcat (sec <sup>-1</sup> )	kcat/Km (mM <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )	Ksi (mM)	Ksi/Km
野生型	27	8899	7451	276	250	9
Thr366Asn	14	10158	8505	608	522	37
Thr366Asp	28	5166	4283	153	332	12

【0040】

#### 実施例7

酵素センサーの作製および評価

5 Uの改変型酵素にカーボンペースト20 mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40 mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で30分間処理した後、20 mMリジンを含む10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

【0041】

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用いて、5 mM-50 mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

【0042】

#### 【配列表】

Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase

<130> psg0017

<150> JP 2002-172955

<151> 2002-06-13

<160> 5

<210> 1

<211> 454

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn

1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile

85 90 95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu

115 120 125

Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His

130 135 140

Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr

145 150 155 160

Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn  
165 170 175  
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr  
180 185 190  
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile  
195 200 205  
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr  
210 215 220  
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys  
225 230 235 240  
Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu  
245 250 255  
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys  
260 265 270  
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys  
275 280 285  
Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val  
290 295 300  
Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro  
305 310 315 320  
Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro  
325 330 335  
Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser  
340 345 350  
Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu  
355 360 365  
Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile  
370 375 380  
Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met

385                      390                      395                      400  
Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly  
                    405                      410                      415  
Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp  
                    420                      425                      430  
Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys  
                    435                      440                      445  
Phe Thr Tyr Lys Ala Lys

450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60  
cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaacccttta ttagaggttt aaaaattctc 120  
ggaaaatttt gacaatttat aagggtggaca catgaataaa catttattgg ctaaaattgc 180  
tttattaagc gctgttcagc tagttacact ctcagcattt gctgatgttc ctctaactcc 240  
atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagtattc tatctaattc 300  
aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggtaa ctgagcgagc 360  
aacaggtaag attctaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaaacag tttttcaggt 420  
accagagatt gtcaatgatg ctgatgggca gaatggttta ttaggttttg ccttccatcc 480  
tgatttttaa aataatcctt atatctatat ttcaggtaca tttaaaaatc cgaaatctac 540  
agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgtcgttat acctataata aatcaacaga 600  
tacgctcgag aagccagtcg atttattagc aggattacct tcatcaaaag accatcagtc 660  
aggtcgtctt gtcattgggc cagatcaaaa gatttattat acgattgggtg accaagggcg 720  
taaccagctt gcttatttgt tcttgccaaa tcaagcacia catacgccaa ctcaacaaga 780  
actgaatggg aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840  
aagtattcca aaggataatc caagttttta cgggggtggtt agccatattt atacacttgg 900

acatcgtaat ccgcagggt tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960  
 aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020  
 gaatgtagca gggtataaag atgatagtgg ctatgcttat gcaaattatt cagcagcagc 1080  
 caataagtca attaaggatt tagctcaaaa tggagtaaaa gtagccgcag ggggccctgt 1140  
 gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200  
 cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgtgga gagatgacct acatttgctg 1260  
 gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaag caattactgg 1320  
 ttgggaaaat acattattgg ttccatcttt aaaacgtggt gtcattttcc gtattaagtt 1380  
 agatccaact tatagcacta cttatgatga cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440  
 ttatcgtgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgatactgc 1500  
 cggaaatgtc caaaaagatg atggctcagt acaaataca ttagaaaacc caggatctct 1560  
 cattaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<220>

<222> 4

<223> Xaa is Met or Trp

<400> 3

Cys Gly Glu Xaa Thr Tyr Ile

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<220>

<222> 4

<223> Xaa is Asp, Lys, Ile or Asn

<400> 4

Gly Glu Met Xaa Tyr Ile Cys

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 5

Glu Met Thr Asp Ile Cys Trp

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 6

Met Thr Tyr Asp Cys Trp Pro

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 7

Thr Tyr Ile Arg Trp Pro Thr

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 8

Pro Thr Val Pro Pro Ser Ser

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> primer for point mutation

<400> 9

caaatgtagg taccctctcc acaagttg 28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 10

caaatgtagg ttccctctcc acaagttg 28

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 11

cagcaaatgt agttcatctc tccacaagtt gg 32

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 12

cagcaaatgt agatcatctc tccacaagtt gg 32

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 13

gccagcaaatt gtagtccatc tctccacaag 30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 14

gccagcaaatt gtatttcac tctccacaag 30

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 15

ccagcaaattg tcggtcattt ctccacaagt tgg 33

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 16

ggccagcaat tgtaggtca 19

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 17

ctgttggcca gcaaagttag g 21

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 18

gcagatgacg gtggaactgt tggc 24

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、本発明において用いたプラスミド pGB2 の構造を示す。

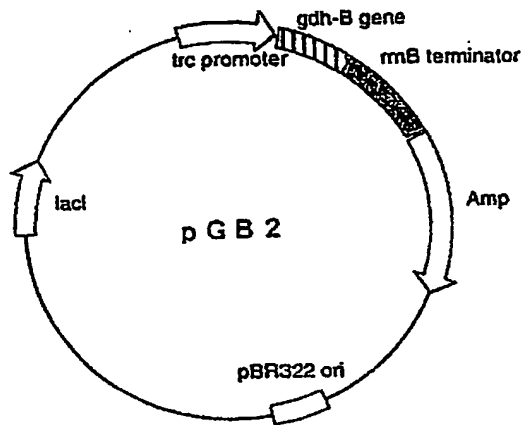
【図 2】 図 2 は、本発明の改変型酵素をコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

【図 3】 図 3 は、本発明の改変型酵素 Tyr367Asp の SV プロットを示す。

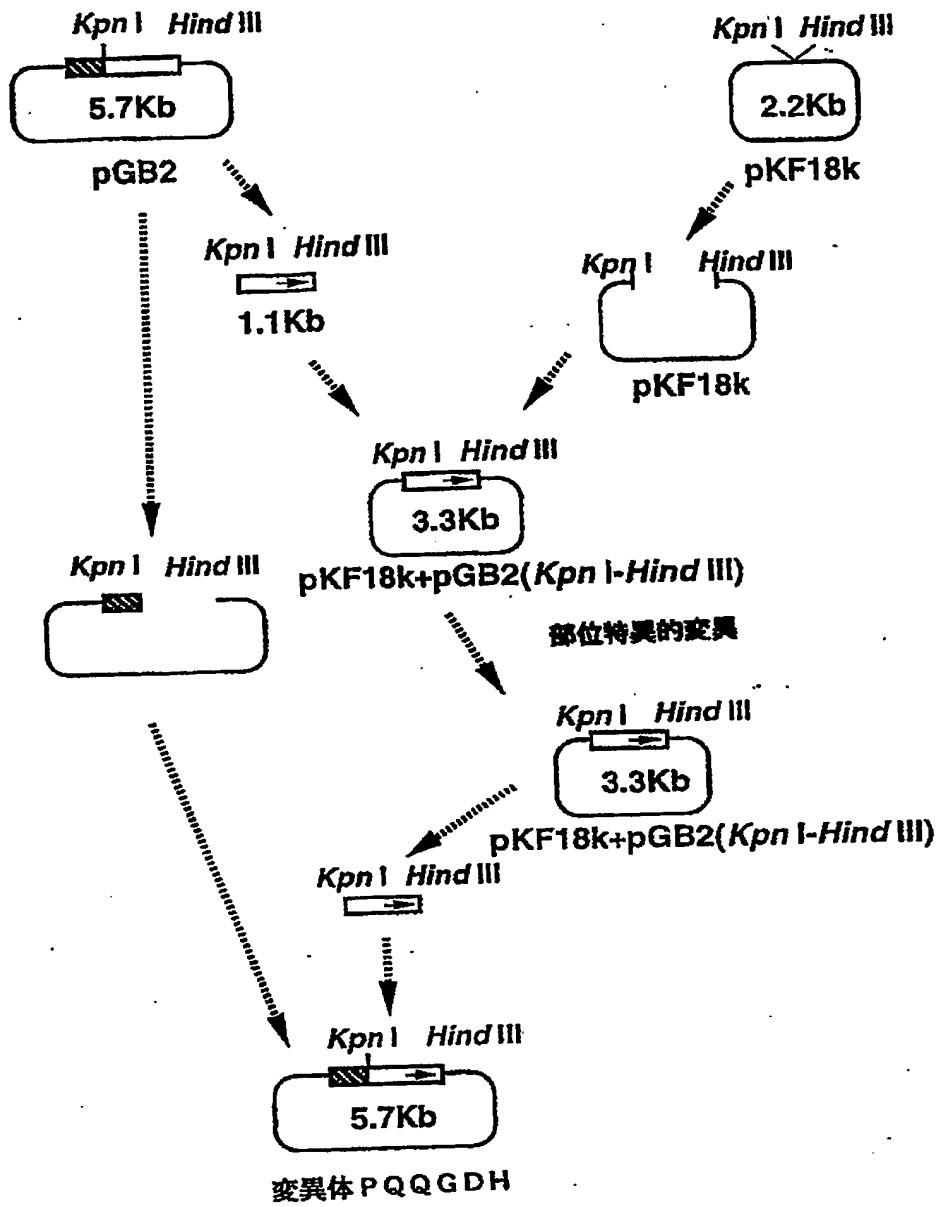
【図 4】 図 4 は、本発明の改変型酵素 Cys369Arg の SV プロットを示す。

【書類名】 図面

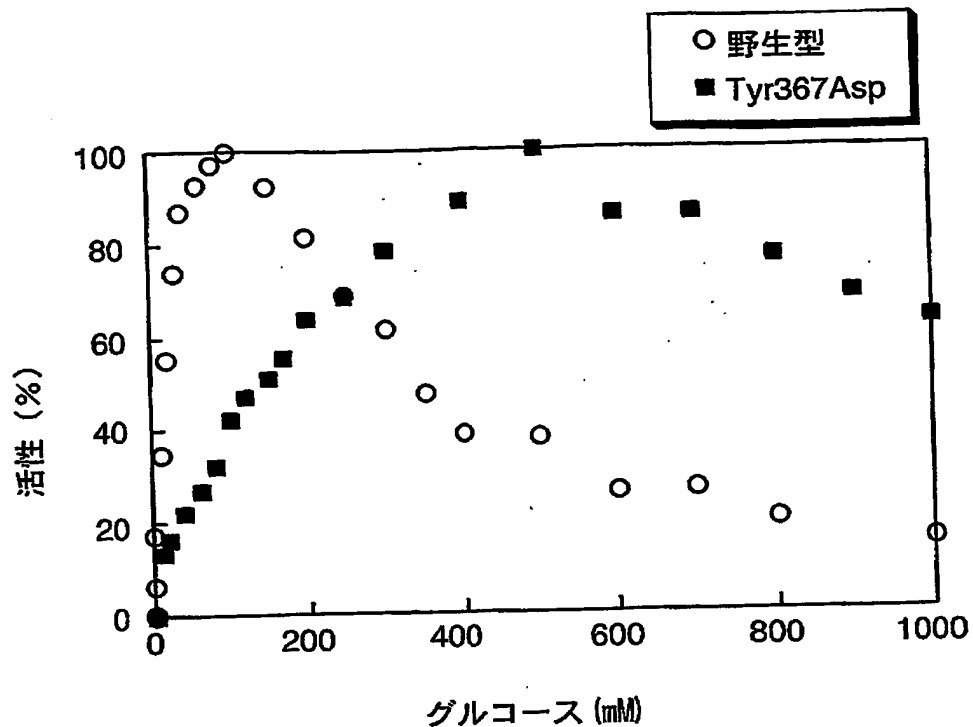
【図1】



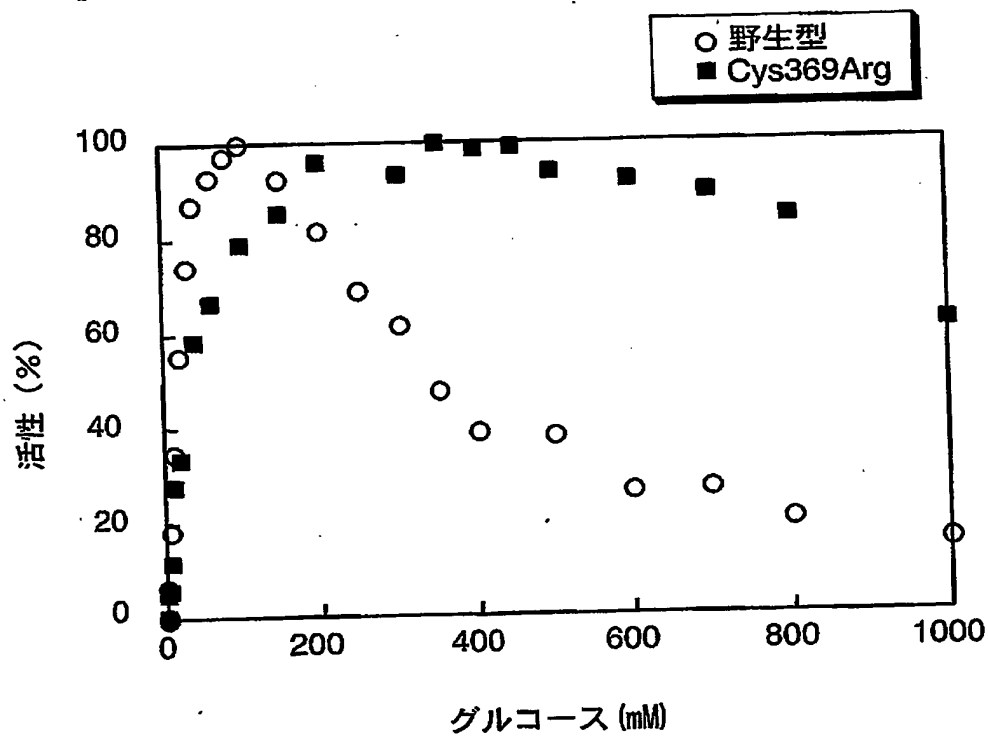
【図2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 グルコースによる基質阻害が小さいため、高濃度のグルコースの存在下におけるグルコースの測定に有用な改変型水溶性PQQGDHを提供すること。

【解決手段】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHの349番目から377番目の残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ阻害定数(K<sub>s</sub>i)が200mM以上であるグルコース脱水素酵素が提供される。

【選択図】 なし

特願 2003-071744

出願人履歴情報

識別番号

[596153357]

1. 変更年月日

1996年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区南1-13-16

氏 名

早出 広司



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**